

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
10. Januar 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/02795 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07462

(22) Internationales Anmeldedatum:  
29. Juni 2001 (29.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 31 842.8 30. Juni 2000 (30.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): GNOTHIS HOLDING SA [CH/CH]; CH-1015 Ecublens (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RIGLER, Rudolf [AT/CH]; 115, rue du Centre, CH-1025 St-Sulpice (CH).

(74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach 860 820, 81635 München (DE).

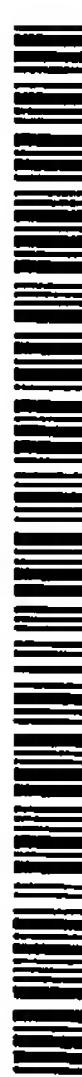
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/02795 A2

(54) Title: MULTIPLEX SEQUENCING METHOD

(54) Bezeichnung: MULTIPLEX-SEQUENZIERUNGSVERFAHREN

(57) Abstract: The invention relates to a method and to a device for the multiplex sequencing of nucleic acid molecules that are immobilized on a substrate.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Multiplex-Sequenzierung von auf einem Träger immobilisierten Nukleinsäuremolekülen.

- 1 -

### **Multiplex-Sequenzierungsverfahren**

#### **Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Multiplex-Sequenzierung von auf einem Träger immobilisierten Nukleinsäuremolekülen.

Die Sequenzierung des aus ca.  $3 \times 10^9$  Basen bestehenden humanen  
10 Genoms oder des Genoms anderer Organismen sowie die Bestimmung und  
der Vergleich individueller Sequenzvarianten erfordert die Bereitstellung von  
Sequenziermethoden, die einerseits schnell sind und andererseits  
routinemäßig und mit geringen Kosten eingesetzt werden können. Obwohl  
große Anstrengungen unternommen worden sind, um gängige  
15 Sequenziermethoden, z.B. die enzymatische Kettenabbruchmethode nach  
Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463), zu  
beschleunigen, insbesondere durch Automatisierung (Adams et al.,  
Automated DNA Sequencing and Analysis (1994), New York, Academic  
Press) können derzeit maximal nur 2.000 Basen pro Tag mit einem  
20 Sequenziergerät bestimmt werden.

Während der letzten Jahre sind neue Ansätze zur Überwindung der  
Beschränkungen konventioneller Sequenzierverfahren entwickelt worden,  
u.a. die Sequenzierung durch Rastertunnelmikroskopie (Lindsay und Phillip,  
25 Gen. Anal. Tech. Appl. 8 (1991), 8-13), durch hochparallelisierte  
Kapillarelektrophorese (Huang et al., Anal. Chem. 64 (1992), 2149-2154;  
Kambara und Takahashi, Nature 361 (1993), 565-566), durch  
Oligonukleotidhybridisierung (Drmanac et al., Genomics 4 (1989), 114-128;  
Khrapko et al., FEBS Let. 256 (1989), 118-122; Maskos und Southern,  
30 Nucleic Acids Res. 20 (1992), 1675-1678 und 1679-1684) sowie durch  
Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisierungs-Massenspektroskopie  
(Hillenkamp et al., Anal. Chem. 63 (1991), 1193A-1203A).

- 2 -

Ein weiterer Ansatz ist die Einzelmolekülsequenzierung (Dörre et al., Bioimaging 5 (1997), 139-152), bei der die Sequenz von Nukleinsäuren durch fortschreitenden enzymatischen Abbau von fluoreszenzmarkierten einzelsträngigen DNA-Molekülen und Nachweis der sequenziell freigesetzten 5 Monomermoleküle in einem Mikrostrukturkanal erfolgt. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass nur ein einziges Molekül der Zielnukleinsäure für die Durchführung einer Sequenzbestimmung ausreicht.

Obwohl durch Anwendung der oben genannten Methoden bereits erhebliche 10 Fortschritte erzielt wurden, besteht ein großes Bedürfnis nach weiteren Verbesserungen. Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren bereitzustellen, das eine weitere Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik darstellt und das eine parallele Bestimmung einzelner 15 Nukleinsäuremoleküle in einem Multiplexformat ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen eines Trägers mit einer Vielzahl von darauf 20 immobilisierten Nukleinsäuremolekülen, wobei die Nukleinsäuremoleküle mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen tragen,
- (b) fortschreitendes Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den immobilisierten Nukleinsäuremolekülen und
- (c) gleichzeitiges Bestimmen der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle aufgrund der bei Abspaltung von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle oder/und der abgespaltenen Nukleotidbausteine.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren ist eine trägergestützte Multiplex-Sequenziermethode, bei der eine Vielzahl von immobilisierten

- 3 -

Nukleinsäuremolekülen gleichzeitig untersucht wird. Der für das Verfahren verwendete Träger kann ein beliebiger planarer oder strukturierter Träger sein, der zur Immobilisierung von Nukleinsäuremolekülen geeignet ist. Beispiele für geeignete Trägermaterialien sind Glas, Kunststoff, Metalle oder Halbmetalle wie etwa Silicium, Metalloxide wie Siliciumoxid etc. Auch die Gestaltung des Trägers kann grundsätzlich beliebig sein, sofern ein Reaktionsraum gebildet werden kann, welcher das fortschreitende Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den auf dem Träger immobilisierten Nukleinsäuren in einem flüssigen Reaktionsgemisch ermöglicht.

Die Nukleinsäuremoleküle werden vorzugsweise über ihre 5'- oder 3'-Enden auf dem Träger immobilisiert, wobei sie in einzelsträngiger Form oder in doppelsträngiger Form vorliegen können. Bei doppelsträngigen Molekülen muss sichergestellt sein, dass markierte Nukleotidbausteine nur von einem einzigen Strang abgespalten werden können. Die Bindung der Nukleinsäuremoleküle an den Träger kann durch kovalente oder nicht kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Beispielsweise kann die Bindung der Polynukleotide an den Träger durch hochaffine Wechselwirkungen zwischen den Partnern eines spezifischen Bindepaares, z.B. Biotin/Streptavidin oder Avidin, Hapten/Anti-Hapten-Antikörper, Zucker/Lectin etc., vermittelt werden. So können biotinylierte Nukleinsäuremoleküle an Streptavidin-beschichtete Träger gekoppelt werden. Alternativ können die Nukleinsäuremoleküle auch adsorptiv an den Träger gebunden werden. So kann eine Bindung von durch Einbau von Alkanthiolgruppen modifizierten Nukleinsäuremolekülen an metallische Träger, z.B. Goldträger, erfolgen. Noch eine weitere Alternative ist die kovalente Immobilisierung, wobei die Bindung der Polynukleotide über reaktive Silangruppen auf einer Silika-Oberfläche vermittelt werden kann.

30

An einen Träger werden mehrere, für eine Sequenzierung vorgesehene Nukleinsäuremoleküle gebunden. Vorzugsweise werden mindestens 100,

- 4 -

besonders bevorzugt mindestens 1.000 und besonders bevorzugt mindestens 10.000 und bis zu mehr als  $10^6$  Nukleinsäuremoleküle an den Träger gebunden. Die gebundenen Nukleinsäurefragmente haben eine Länge von vorzugsweise 200 bis 2.000 Nukleotide, besonders bevorzugt 400 bis 5 1.000 Nukleotide. Die an den Träger gebundenen Nukleinsäuremoleküle, z.B. DNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, enthalten mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen, wobei vorzugsweise mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % und am meisten bevorzugt im wesentlichen alle, z.B. mindestens 90 %, der Nukleotidbausteine von einem Basentyp 10 eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen. Derart markierte Nukleinsäuren können durch enzymatische Primerextension an einer Nukleinsäurematrize unter Verwendung einer geeigneten Polymerase, z.B. einer DNA-Polymerase wie etwa Taq-Polymerase, einer thermostabilen DNA-Polymerase von Thermococcus gorgonarius oder anderen thermostabilen Organismen 15 (Hopfner et al., PNAS USA 96 (1999), 3600-3605) oder einer mutierten Taq-Polymerase (Patel und Loeb, PNAS USA 97 (2000), 5095-5100) unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Nukleotidbausteine erzeugt werden.

Die markierten Nukleinsäuremoleküle können auch durch Amplifikationsreaktionen, z.B. PCR, hergestellt werden. So entstehen bei einer asymmetrischen PCR Amplifikationsprodukte, bei denen nur einziger Strang Fluoreszenzmarkierungen enthält. Derartige asymmetrische Amplifikationsprodukte können in doppelsträngiger Form sequenziert werden. Durch symmetrische PCR werden Nukleinsäurefragmente hergestellt, bei denen beide Stränge 25 fluoreszenzmarkiert sind. Diese beiden fluoreszenzmarkierten Stränge können separiert und getrennt in einzelsträngiger Form immobilisiert werden, so daß die Sequenz eines oder beider Komplementärstränge separat bestimmt werden kann. Alternativ kann einer der beiden Stränge am 3'-Ende derart modifiziert werden, z.B. durch Einbau einer PNA-Klammer, sodass 30 eine Abspaltung von Monomerbausteinen nicht mehr möglich ist. In diesem Fall ist eine Doppelstrangsequenzierung möglich.

- 5 -

Vorzugsweise tragen im Wesentlichen alle Nukleotidbausteine von mindestens zwei Basentypen, beispielsweise zwei, drei oder vier Basentypen, eine Fluoreszenzmarkierung, wobei jeder Basentyp günstigerweise eine unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungsgruppe trägt.

5 Wenn die Nukleinsäuremoleküle nicht vollständig markiert sind, so kann durch parallele Sequenzierung von mehreren Molekülen dennoch die Sequenz vollständig bestimmt werden.

Die Nukleinsäurematrize, deren Sequenz bestimmt werden soll, kann 10 beispielsweise aus DNA-Matrizen wie genomischen DNA-Fragmenten, cDNA-Molekülen, Plasmiden etc., aber auch aus RNA-Matrizen wie mRNA-Molekülen ausgewählt werden.

15 Die Fluoreszenzmarkierungsgruppen können aus bekannten zur Markierung von Biopolymeren, z.B. Nukleinsäuren, verwendeten Fluoreszenzmarkierungsgruppen, wie etwa Fluorescein, Rhodamin, Phycoerythrin, Cy3, Cy5 oder Derivaten davon etc. ausgewählt werden.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren beruht darauf, dass in Nukleinsäurestränge eingebaute Fluoreszenzmarkierungsgruppen Wechselwirkungen mit benachbarten Gruppen, beispielsweise mit chemischen Gruppen der Nukleinsäuren, insbesondere Nukleobasen wie etwa G, oder/und benachbarten Fluoreszenzmarkierungsgruppen eingehen, die zu einer Änderung der Fluoreszenz, insbesondere der 25 Fluoreszenzintensität gegenüber den Fluoreszenzmarkierungsgruppen in "isolierter" Form aufgrund von Quench- oder/und Energietransfer-Vorgängen führen. Durch das Abspalten einzelner Nukleotidbausteine verändert sich die Gesamtfluoreszenz, z.B. die Fluoreszenzintensität eines immobilisierten Nukleinsäurestranges abhängig von der Abspaltung einzelner 30 Nukleotidbausteine, d.h. abhängig von der Zeit. Diese zeitliche Änderung der Fluoreszenz kann parallel für eine Vielzahl von Nukleinsäuremolekülen erfasst und mit der Basenfolge der einzelnen Nukleinsäurestränge korreliert

- 6 -

werden. Vorzugsweise werden solche Fluoreszenzmarkierungsgruppen verwendet, die, wenn sie in den Nukleinsäurestrang eingebaut sind, zumindest teilweise gequencht sind, so dass nach Abspaltung des die 5 Markierungsgruppe enthaltenden Nukleotidbausteins oder eines benachbarten Bausteins, der ein Quench verursacht, die Fluoreszenzintensität erhöht wird.

Die Sequenzierungsreaktion des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst das 10 fortschreitende Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den immobilisierten Nukleinsäuremolekülen. Vorzugsweise erfolgt eine enzymatische Abspaltung unter Verwendung einer Exonuklease, wobei 15 Einzelstrang- bzw. Doppelstrang-Exonukleasen, die in 5'→3'-Richtung oder 3'→5'-Richtung abbauen - je nach Art der Immobilisierung der Nukleinsäurestränge auf dem Träger - eingesetzt werden können. Besonders bevorzugt werden als Exonukleasen T7 DNA-Polymerase, E.coli Exonuklease I oder E.coli Exonuklease III verwendet.

Während der fortschreitenden Abspaltung einzelner Nukleotidbausteine kann 20 eine Änderung der Fluoreszenzintensität des immobilisierten Nukleinsäurestrangs oder/und des abgespaltenen Nukleotidbausteins aufgrund von Quench- oder Energietransfervorgängen gemessen werden. Diese zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität ist von der Basenfolge 25 des untersuchten Nukleinsäurestrangs abhängig und kann daher mit der Sequenz korreliert werden. Zur vollständigen Sequenzbestimmung eines Nukleinsäurestrangs werden üblicherweise mehrere - an unterschiedlichen 30 Basen, z.B. A, G, C und T bzw. Kombinationen von zwei verschiedenen Basen - markierte Nukleinsäurestränge vorzugsweise durch enzymatische Primerextension, wie zuvor beschrieben, erzeugt und auf dem Träger immobilisiert, wobei die Immobilisierung an statistischen Orten des Trägers oder aber auch ortsspezifisch erfolgen kann. Gegebenenfalls kann an den zu untersuchenden Nukleinsäurestrang noch ein "Sequenzidentifikator", d.h. eine markierte Nukleinsäure bekannter Sequenz, angefügt werden, z.B.

- 7 -

durch enzymatische Reaktion mit Ligase oder/und Terminaler Transferase, sodass zu Beginn der Sequenzierung zunächst ein bekanntes Fluoreszenzmuster und anschließend erst das der unbekannten, zu untersuchenden Sequenz entsprechende Fluoreszenzmuster erhalten wird.

5 Insgesamt werden auf einem Träger vorzugsweise  $10^3$  bis  $10^6$  Nukleinsäurestränge immobilisiert.

Um die Entfernung abgespaltener Nukleotidbausteine von den immobilisierten Nukleotidsträngen zu beschleunigen, wird im Reaktionsraum 10 vorzugsweise ein Konvektionsfluss vom Träger weg erzeugt. Die Flussgeschwindigkeit kann dabei im Bereich von 1 bis 10 mm/s liegen.

Die Detektion umfasst vorzugsweise eine Mehrpunkt-Fluoreszenzanregung durch Laser, z.B. eine Punktmatrix von Laserpunkten erzeugt durch eine 15 Diffraktionsoptik oder einen Quanten-Well-Laser. Die durch Anregung erzeugte Fluoreszenzemission mehrerer Nukleinsäurestränge kann durch eine Detektormatrix erzeugt werden, die beispielsweise eine elektronische Detektormatrix, z.B. eine CCD-Kamera oder eine Avalanche-Fotodiodenmatrix, umfasst. Die Detektion kann derart erfolgen, dass 20 Fluoreszenzanregung und Detektion an allen untersuchten Nukleinsäuresträngen parallel erfolgt. Alternativ dazu kann in mehreren Schritten jeweils ein Teil der Nukleinsäurestränge unter Verwendung einer Submatrix von Laserpunkten und Detektoren vorzugsweise unter Verwendung einer Hochgeschwindigkeitsscannerprozedur untersucht 25 werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Träger zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend eine Vielzahl von darauf immobilisierten Nukleinsäuremolekülen, wobei die Nukleinsäuremoleküle in einzelsträngiger 30 Form vorliegen und mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen tragen.

- 8 -

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend

- (a) einen Träger wie zuvor spezifiziert,
- (b) einen Reaktionsraum zum fortschreitenden Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den immobilisierten Nukleinsäuremolekülen und
- (c) Mittel zum gleichzeitigen Bestimmen der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle aufgrund der bei Abspaltung von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle oder/und der abgespaltenen Nukleotidbausteine.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise für die Analyse von Genomen und Transkriptomen bzw. für differenzielle Analysen, z.B. Untersuchungen bezüglich des Unterschieds im Genom bzw. Transkriptom einzelner Spezies oder Organismen innerhalb einer Spezies eingesetzt werden.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Figuren erläutert werden. Es zeigen:

Figur 1:

- (A) die schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Trägers (2) mit einer Vielzahl von daran immobilisierten einzelsträngigen Nukleinsäuremolekülen (4). Ein Träger mit einer Fläche von 1 bis 2 cm<sup>2</sup> kann beispielsweise bis zu 10<sup>6</sup> Nukleinsäurestränge enthalten.
- (B) die an den Träger (2) immobilisierten Nukleinsäuremoleküle (4) können einen 5'-biotinylierten (oder mit einer anderen Festphasenbindegruppe versehenen) Primer (4a), einen zu sequenzierenden fluoreszenzmarkierten Abschnitt (4b) und gegebenenfalls einen fluoreszenzmarkierten Sequenzidentifikator (4c)

- 9 -

umfassen. Durch Einwirkung einer Exonuklease (6) werden fortlaufend einzelne Nukleotidbausteine (8) abgespalten. Während die in den Nukleinsäurestrang eingebauten Nukleotidbausteine aufgrund von Quenchvorgängen keine oder nur eine geringe Fluoreszenz zeigen, wird die Fluoreszenz nach der Abspaltung erhöht.

**Figur 2:**

(A) eine erste Ausführungsform der Erfindung, wobei auf die auf dem Träger (2) immobilisierten Nukleinsäuremoleküle (4) von einem Laser (6) mit Anregungslicht (8) bestrahlt werden, welches von einem diffraktionsoptischen Element (10) auf die einzelnen immobilisierten Nukleinsäurestränge gelenkt wird. Das Fluoreszenzemissionslicht (12) wird von einer Detektormatrix (14), z.B. einer CCD-Kamera, aufgezeichnet.

(B) In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird ein Träger (20) mit darin integriertem Quanten-Well-Laser (60) eingesetzt.

- 10 -

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend die Schritte:
  - (a) Bereitstellen eines Trägers mit einer Vielzahl von darauf immobilisierten Nukleinsäuremolekülen, wobei die Nukleinsäuremoleküle mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen tragen,
  - (b) fortschreitendes Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den immobilisierten Nukleinsäuremolekülen und
  - (c) gleichzeitiges Bestimmen der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle aufgrund der bei Abspaltung von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle oder/und der abgespaltenen Nukleotidbausteine.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man einen planaren Träger verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass man einen strukturierten Träger verwendet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Nukleinsäuremoleküle über ihre 5'- oder 3'-Enden auf dem Träger immobilisiert werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,

- 11 -

dass die Nukleinsäuremoleküle in einzelsträngiger Form auf dem Träger immobilisiert werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
5 dadurch gekennzeichnet,  
dass die Nukleinsäuremoleküle in doppelsträngiger Form auf dem Träger immobilisiert werden, wobei markierte Nukleotidbausteine nur von einem einzigen Strang abgespalten werden können.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Nukleinsäuremoleküle derart markiert sind, dass mindestens 50 % aller Nukleotidbausteine von einem Basentyp eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass im Wesentlichen alle Nukleotidbausteine von einem Basentyp eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen.
- 20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass das Abspalten einzelner Nukleotidbausteine durch eine Exonuklease erfolgt.
- 26 10. Verfahren nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass T7 DNA-Polymerase, E.coli Exonuklease I oder E.coli Exonuklease III verwendet wird.
- 30 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,

- 12 -

dass das Bestimmen der Basenfolge eine Mehrpunkt-Fluoreszenzanregung durch Laser umfasst.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
5 dadurch gekennzeichnet,  
dass das Bestimmen der Basenfolge eine Detektion der Fluoreszenzemission mehrerer Nukleinsäurestränge durch eine Detektionsmatrix umfasst.
- 10 13. Verfahren nach Anspruch 12,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine CCD-Kamera oder eine Avalanche-Fotodiodenmatrix verwendet wird.
- 15 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass Fluoreszenzanregung und -detektion an allen untersuchten Nukleinsäuresträngen parallel erfolgt.
- 20 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass Fluoreszenzanregung und -detektion in mehreren Schritten jeweils an einen Teil der untersuchten Nukleinsäurestränge unter Verwendung einer Submatrix von Laserpunkten und Detektoren erfolgt.
- 25 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass während der Bestimmung ein Konvektionsfluss vom Träger weg erzeugt wird.
- 30 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

- 13 -

dadurch gekennzeichnet,

dass die Fluoreszenzmarkierungsgruppen, wenn sie in die Nukleinsäurestränge eingebaut sind, zumindest teilweise gequencht sind, und dass nach Abspaltung die Fluoreszenzintensität erhöht wird.

5

10

18. Träger zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend eine Vielzahl von darauf immobilisierten Nukleinsäuremolekülen, wobei die Nukleinsäuremoleküle in einzelsträngiger Form vorliegen und mehrere Fluoreszenzmarkierungsgruppen tragen.

15

19. Träger nach Anspruch 18,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Nukleinsäuremoleküle derart markiert sind, dass mindestens 50 % aller Nukleotidbausteine von einem Basentyp eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen.

20

20. Träger nach Anspruch 18 oder 19,

dadurch gekennzeichnet,

25

dass die Nukleinsäuremoleküle eine Länge von 200 bis 2000 Nukleotide aufweisen.

21. Vorrichtung zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, umfassend

25

(a) einen Träger nach einem der Ansprüche 18 bis 20,

30

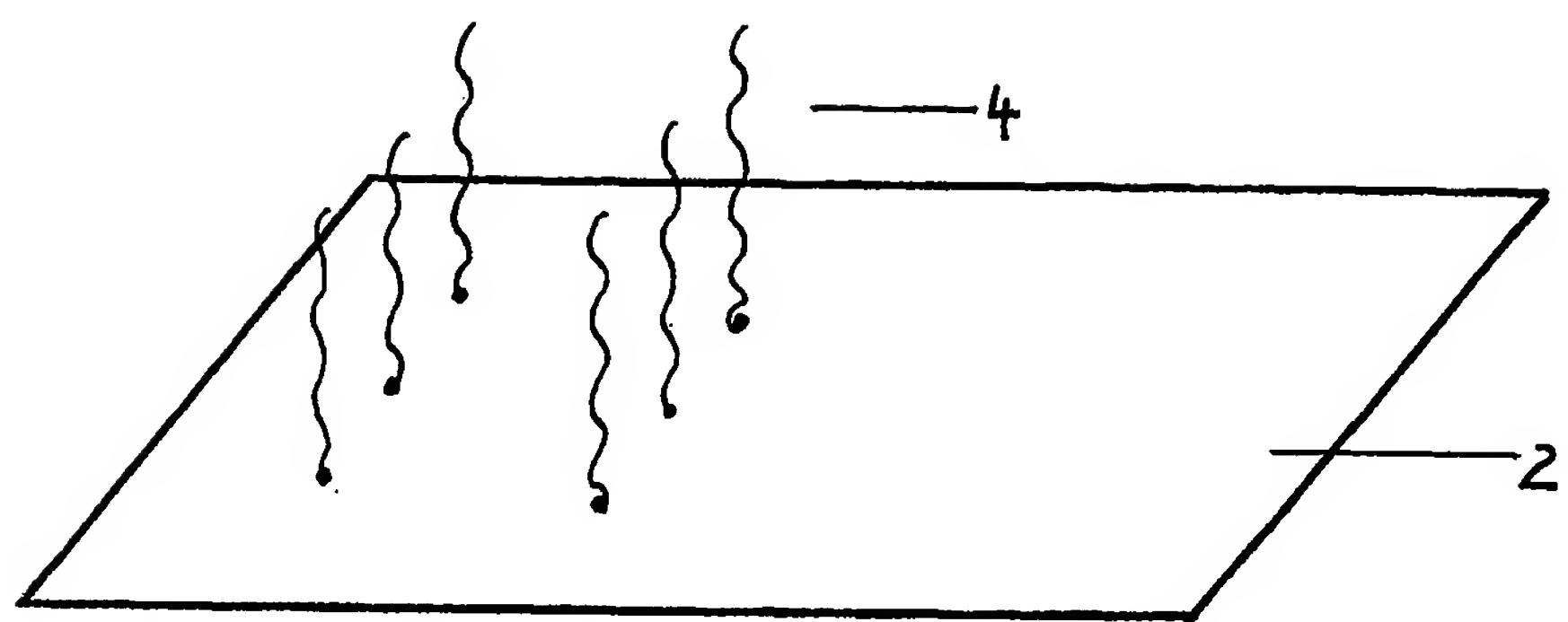
(b) einen Reaktionsraum zum fortschreitenden Abspalten einzelner Nukleotidbausteine von den immobilisierten Nukleinsäuremolekülen und

(c) Mittel zum gleichzeitigen Bestimmen der Basenfolge mehrerer Nukleinsäuremoleküle aufgrund der bei Abspaltung von Nukleotidbausteinen hervorgerufenen zeitabhängigen Änderung der Fluoreszenz der Nukleinsäuremoleküle oder/und der abgespaltenen Nukleotidbausteine.

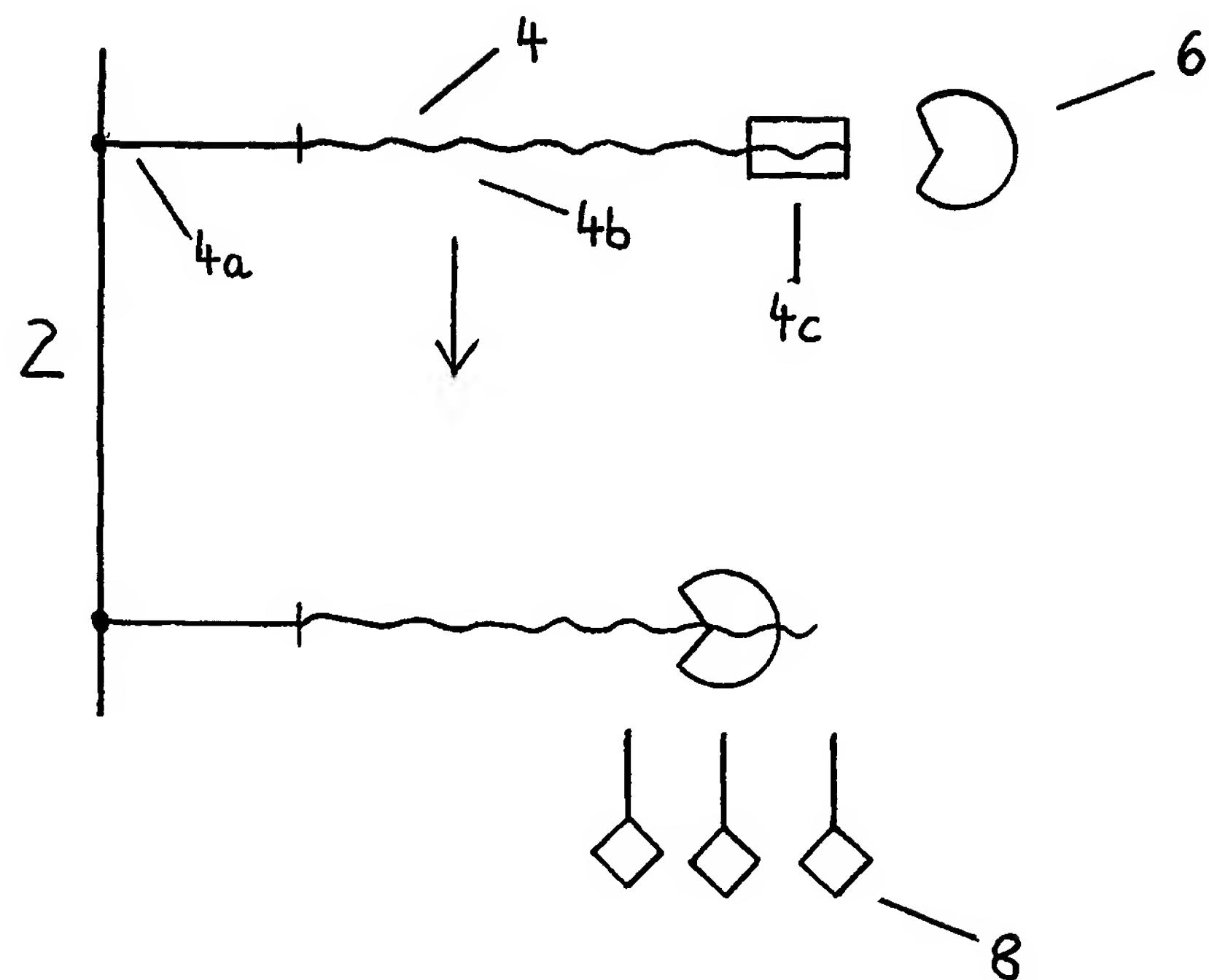
- 14 -

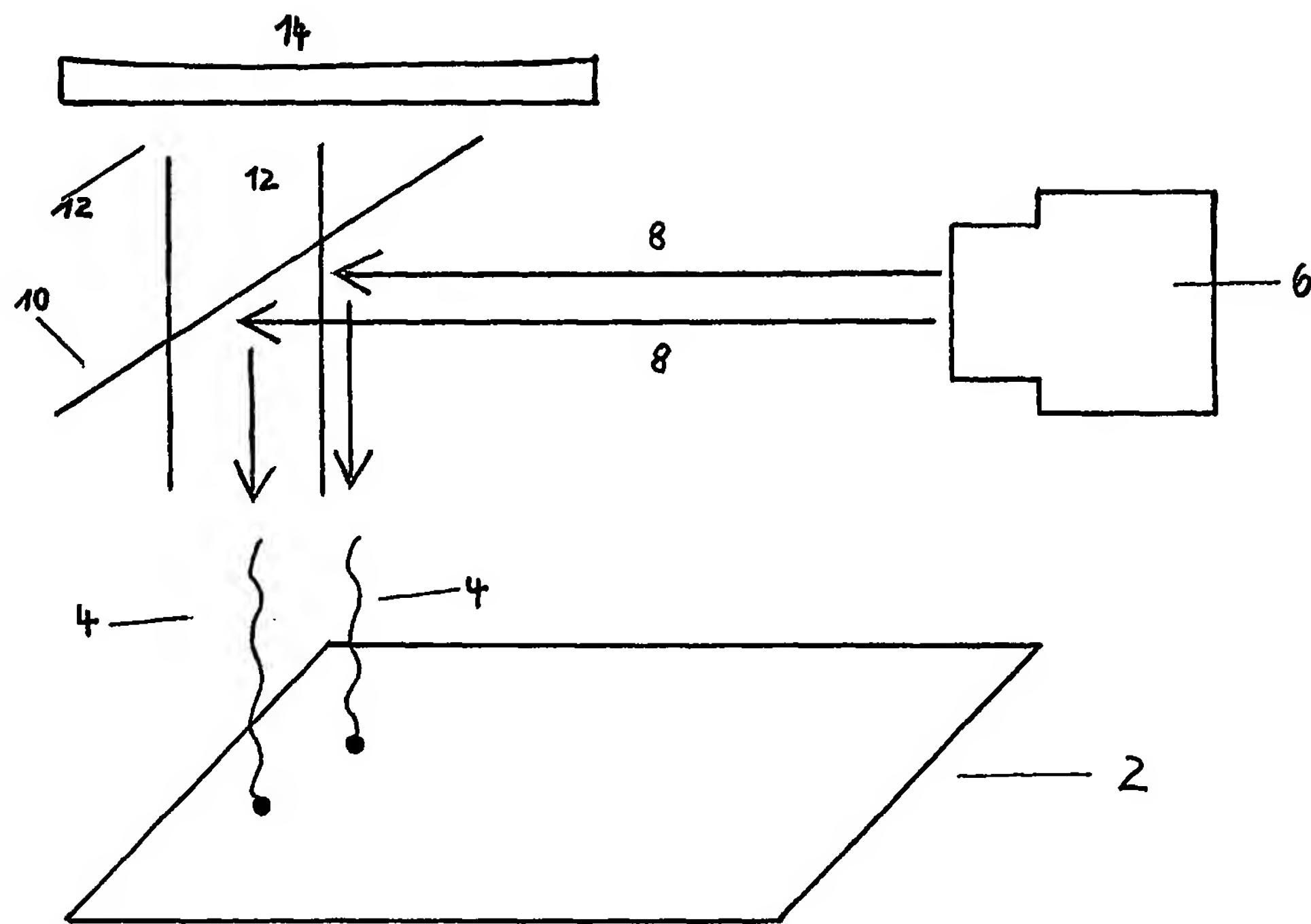
22. Verwendung des Trägers nach einem der Ansprüche 18 bis 20 oder der Vorrichtung nach Anspruch 21 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17.

**Figur 1A**



Figur 1B



**Figur 2A****Figur 2B**